

**Szegedi Tudományegyetem**

**Gyógyszerésztudományi Kar**

**Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet**



**Az aquaporin 5 szerepe a késői vemhes patkány uterus működésében: farmakológiai vizsgálatok**

**Ph.D. tézis összefoglaló**

**Csányi Adrienn**

**Szeged**

**2019**



**Szegedi Tudományegyetem**  
**Gyógyszertudományok Doktori Iskola**

**Ph.D. program:** Gyógyszerhatástan, Biofarmácia és Klinikai gyógyszerészet

**Programvezető:** Dr. Zupkó István Ph.D.

**Intézet:** Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

**Témavezető:** Dr. Ducza Eszter Ph.D.

**Csányi Adrienn**

**Az aquaporin 5 szerepe a késői vemhes patkány uterus működésében: farmakológiai vizsgálatok**

**Szigorlati bizottság:**

**Elnök:** Dr. Zupkó István Ph.D.

**Tagok:** Dr. Kékesi Gabriella Ph.D.

Dr. Szőke Éva Ph.D.

**Bíráló bizottság:**

**Elnök:** Prof. Dr. Révész Piroska MTA doktor

**Opponensek:**

emer. Prof. Dr. Borsodi Anna MTA doktor

Dr. Tábi Tamás Ph.D.

**Tag:**

Dr. Doró Péter Ph.D.

**Titkár:**

Dr. Berkó Szilvia Ph.D.

## Bevezetés

Az aquaporin (AQP) víz csatornáknak fontos szerepe van az élő szervezetekben a víz homeosztázisának szabályozásában. Nemcsak a vérerekben, tüdőben, vesében, de a reproduktív szervekben is nélkülözhetetlen a működésük. Felelősek a vaginális lubrikációért, és megtalálhatóak a petefészekben is, ahol az ovuláció különböző fázisainak megfelelően változik az expressziójuk. Az AQP-ok a méhben és a cervixben is jelen vannak; lehetővé téve a cervix érését, az embrió implantációját és az endometrium kifejlődését. Korábbi kutatásaink bizonyítják, hogy az AQP1, 2, 3, 5, 8 és 9 vízcsatornák megtalálhatók a késői vemhes patkány uterusban is. Erőteljes akkumuláció volt megfigyelhető az AQP5 altípus esetében, mely drámaian lecsökkent a vemhesség utolsó napjára. Az AQP5 expresszió oxitocin által szabályozott vemhes patkány uterusban és feltehetően szerepe van a szülés szabályozásában is.

Vizsgálatok igazolják, hogy ezen vízcsatorna expresszióját különböző nemi hormonok befolyásolják. Az AQP5 expresszió módosulhat a hormonális változásoknak, például menstruációs ciklusnak, megfelelően és emelkedett expressziót mutat a beágyazódási időszakban.

A fertőzések gyakran okoznak koraszülést, ami növeli a perinatális morbiditás és mortalitás előfordulását. Ezért az antibiotikumok széles körben alkalmazott szerek fertőzés okozta koraszülés kezelésében. A foszfomicin és az amoxicillin gyakran használt antibiotikum bakteriuria és bakteriális vaginózis ellen várandósság alatt, melynek hatása ismeretlen az AQP expresszióra.

A transient receptor vanilloid 4 (TRPV4) egy feszültség-függő  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna, amit fizikai (hő, sejt duzzadás) és kémiai hatások egyaránt aktiválhatnak. Megtalálható többek között a kardiovaszkuláris, idegi, légúti és reproduktív szervrendszerekben. Vizsgálatok bizonyították, hogy a TRPV4 és AQP5 csatornák között működésbeli kapcsolat van; például esszenciális a TRPV4 és AQP5 csatornák együttműködése a szabályozott térfogat csökkenéshez a nyálmirigy sejtekben. Ez a kation csatorna fellelhető patkány méh simaizom sejtekben is.

## Célkitűzések

Korábban vizsgáltuk az AQP5 expresszió dinamikus változását a vemhesség alatt, így célunk volt tanulmányozni a hormonok AQP5 expresszióra kifejtett hatását is. Kutatásunk első célja az volt, hogy (1) megállapítsuk az ösztrogén és progeszteron receptor agonista előkezelés hatását az AQP5 mRNS és fehérje expresszióra patkány uterusban a vemhesség végső

fázisában. Célunk megvalósításához (2), hormonálisan indukált koraszülés modellen is megvizsgáltuk az AQP5 expressziót.

Néhány antibiotikum használata engedélyezett várandósság alatt, de kevés információnk van arról, hogy ezek hogyan befolyásolják az AQP5 expressziót és ezáltal a méhkontrakciót. Ezért következőkben (3) az antibiotikum (amoxicillin, foszfomicin, doxiciklin) kezelések hatását vizsgáltuk az AQP5 expressziójára és az uterus kontrakciókra, hogy meghatározzuk ezen profilaktikus antibiotikumok hatását a koraszülésre.

Azt feltételeztük, hogy ozmotikus úton - AQP5 csatornán keresztül - szabályozható a TRPV4 működése és az uterus kontrakciója. Bizonyításához (4) az AQP5 és TRPV4 koexpresszióját és kooperációját vizsgáltuk meg vemhes uterusban és (5) közös szabályozó hatásukat az uterus kontrakcióira.

## **Anyagok és módszerek**

### **Állatkísérletek**

Az állatkísérleteket az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (engedélyszám: IV/198/2013 és IV/3796/2015) engedélyével végeztük.

Az ivarérett Sprague-Dawley patkányokat (nőstények: 180-200g és hímek: 240-260g) speciális ketrecben pároztattuk a kora reggeli órákban. A nőstény állatokból hüvelykenetet vettünk. Pozitív vizsgálat esetén a nőstény patkányokat elkülönítettük, mint első napos vemhes állatok.

### ***In vivo* női nemi hormon és antibiotikum kezelés**

A 17 $\beta$ -ösztadiol (E), tamoxifen (T), klomifen (C) előkezelések a vemhesség 14. és 18. napjától kezdődtek. A hatóanyagok olívaolajban voltak szuszpendálva és szubkután injekció formájában kapták a kísérleti állatok napi egyszer, négy napig, a következő dózisokban: E: 1  $\mu$ g/0,1 ml, T: 5 mg/0,1 ml és C: 1 mg/0,1 ml.

A vemhes patkányokat progeszteronnal (P), levonorgesztrellel (L) és medroxiprogesztéron-acetáttal (MPA) kezeltük a vemhesség 11. és 15. napjától. A hormonok olívaolajban voltak szuszpendálva. A kísérleti állatok szubkután kapták napi egyszer, hét napon keresztül, a következő dózisokban: P és L: 0,5 mg/0,1 ml, és MPA: 5 mg/0,1ml. A 18. és 22. vemhességi napokon a méhszöveteket eltávolítottuk és molekuláris biológiai vizsgálatokat végeztünk.

A koraszüléssel (KSZ) csoportot egy korábbi vizsgálat protokollja alapján kezeltük. A vemhes állatok mifeprisztont kaptak, olívaolajban szuszpendálva, szubkután injekció formájában, 3 mg/0,1 ml dózisban a vemhesség 19. napján délelőtt. Az intravaginális prosztaglandin E2 0,5 mg/ml dózisban ugyanazon a napon délután lett adva. A következő napon, a vemhesség

20. napján kezdődött a koraszülés. A KSZ beindulása után méhszövetet gyűjtöttünk és molekuláris biológiai vizsgálatokat végeztünk.

A vemhes állatoknak az amoxicillint (A) a vemhesség 16. napjától adtuk. Szonda segítségével, per os kapták a kezelést 40 mg/ttkg dózisban, napi egyszer, hét napon keresztül. A szuszpenziót tisztított vízzel készítettük.

A foszfomicin (F) kezelést a vemhesség 21. napján kapták az állatok. Az oldatot tisztított vízzel készítettük el. Per os egyszer adtuk a kezelést 40 mg/ttkg dózisban.

A doxiciklin (D) kezelést a vemhesség 16. napjától kapták a kísérleti állatok. D kezelést per os 30 mg/ttkg dózisban adtuk, hét napon keresztül, napi egyszer. A szuszpenziót metil-cellulózzal készítettük. A vemhesség utolsó napján uterus szöveteket gyűjtöttünk és molekuláris biológiai vizsgálatokat végeztünk.

### **RT-PCR vizsgálatok**

Az RT-PCR vizsgálatokat patkány uterus szöveteken végeztük (n=6 minden kísérletben). Teljes RNS-t guanidinium tiocianát-sav-fenol-kloroformmal, Chomzynski és Sacchi általi protokollal vontuk ki. A PCR termékek reverz transzkripcióját és amplifikációját TaqMan RNA-to-CT<sup>TM</sup> Step One Kit és ABI StepOne Real-Time cycler használatával végeztük. Minden mintával három párhuzamos mérést végeztünk. A próbák fluoreszcens intenzitását a PCR ciklus szám függvényében ábrázoltuk.

### **Western blot analízis**

25 µg fehérje mintát használtunk zsebenként elektroforézishez 4-12%-os NuPAGE Bis-Tris gélre XCellSureLock Mini-Cell Units készülékben. A fehérjét nitrocellulóz membránra transzformáltuk iBlot Gel Transfer alkalmazásával. Ponceau S oldattal ellenőriztük le, hogy megfelelő volt-e a futtatás és a transzformálás. A membránokat az AQP5, TRPV4 és β-aktin elsődleges poliklonális antitesttel egy éjszakát hagytuk inkubálódni blokkoló oldatban. Az antitestek kötődését Western Breeze<sup>®</sup> Chromogenic immunodetection kit segítségével detektáltuk. A képek elemzése az EDAS290 képalkotó rendszerrel, az immunreaktív sávok optikai denzitásának meghatározása Kodak ID Images szoftverrel történt. A β-aktint használtuk belső kontrollként a szemi-kvantitatív eljáráshoz.

### **Immunhisztokémiai vizsgálat**

Az uterus szeleteket, az immunhisztokémiai vizsgálatához történő előkészítés után, belehelyeztük a blokkoló oldatba, melyekhez nyúl poliklonális anti-TRPV4 és AQP5 elsődleges antitestet adtunk. Ezután az inkubációt Histo-Labeling rendszer anti-nyúl másodlagos antitesttel végeztük, ami konjugálva volt peroxidázzal és láthatóvá 3,3'-diaminobenzidin tetrakloriddal tettük. A szövettani festéshez hematoxillint használtunk. A

kettős immunfluoreszcens analízist Tyramide Signal Amplification Kittel végeztük, amihez floureszcens jelölt tyramide-ot használtunk a piros, és direkt jelölt másodlagos antitestet a zöld szín detektálásához. A felvételeket Olympus Fluoview-1000 készülékkel készítettük, a skála 50  $\mu\text{m}$ -t jelöl. A TRPV4 és AQP5 pozitív miometrium sejtek számolása 3 különböző standardizált területről készült mindegyik szeletről, ImageJ szoftver alkalmazásával.

### ***In vitro* kontraktilitási vizsgálatok**

Az uterus szöveteket a 18. vagy 22. vemhességi napon távolítottuk el a vemhes patkányokból. 5 mm-es gyűrűket metszettünk az uterus mindkét szarvából. Az előfeszítés mértékét 1,5 g-ra állítottuk, ami az inkubációs idő végére 0,5 g-ra csökkent. A méhkontrakciók mérését és feldolgozását a SPEL Advanced ISOSYS Data Acquisition rendszerrel végeztük. A spontán kontrakciókat 4 percig rögzítettük és kumulatív oxitocin koncentráció válasz görbéket ( $10^{-12}$ – $10^{-8}$ M) szerkesztettünk minden kísérletben.

A TRPV4 agonista és antagonistá hatóanyagok vizsgálatához, KCl oldatot használtunk a ritmikus kontrakciók kiváltásához. A TRPV4 antagonistá (RN1734) és a TRPV4 agonista (RN1747) anyagokat  $3 \times 10^{-8}$ - $10^{-5}$ M koncentráció tartományban, kumulatív módon vizsgáltuk. Az egyes beadott dózisok között 5 perc telt el. Az RN1734 és RN1747 hatásait a KCl által kiváltott kontrakciók görbe alatti területének (AUC) százalékában fejeztük ki. Koncentráció válasz görbéket rögzítettük és az  $EC_{50}$  and  $E_{\max}$  értékek statisztikai analízisét elvégeztük.

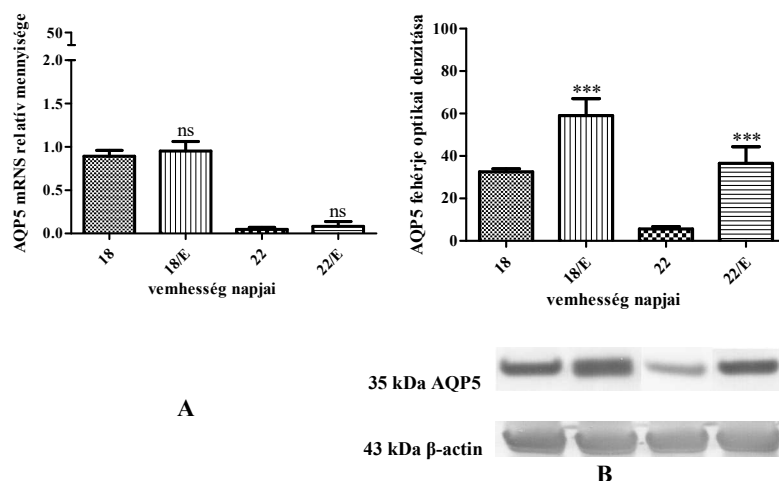
## **Eredmények**

### **Ösztrogén-analóg hatóanyagok hatása az AQP5 expresszióra vemhes patkány uterusban**

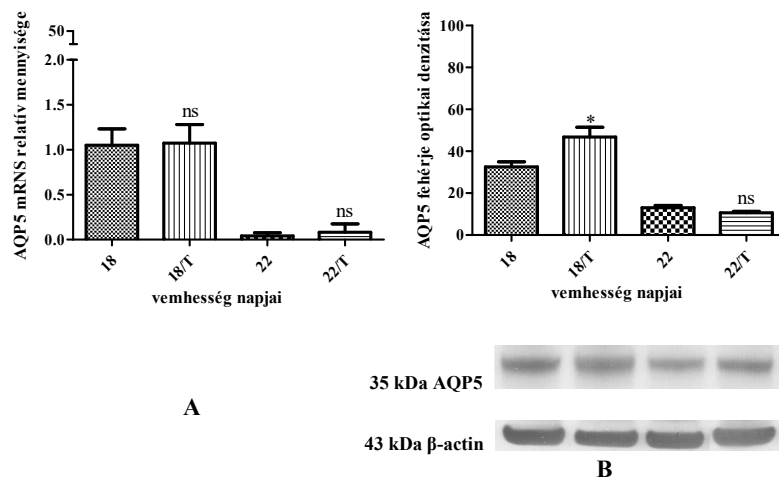
Az E előkezelés nem eredményezett szignifikáns változást az AQP5 mRNS szintjében, hatástalan volt mind a 18., mind a 22. vemhességi napon (**1.A ábra**). A fehérje expressziójában szignifikáns emelkedést okozott a vemhesség 18. és 22. napján is a kontrollhoz képest (**1.B ábra**).

T előkezelés esetén nem tapasztaltunk változást az AQP5 mRNS szintjében (**2.A ábra**). Bár az AQP5 fehérje expressziója növekedett a vemhesség 18. napján, de nem változott a vemhesség utolsó napján a kontrollhoz hasonlítva (**2.B ábra**).

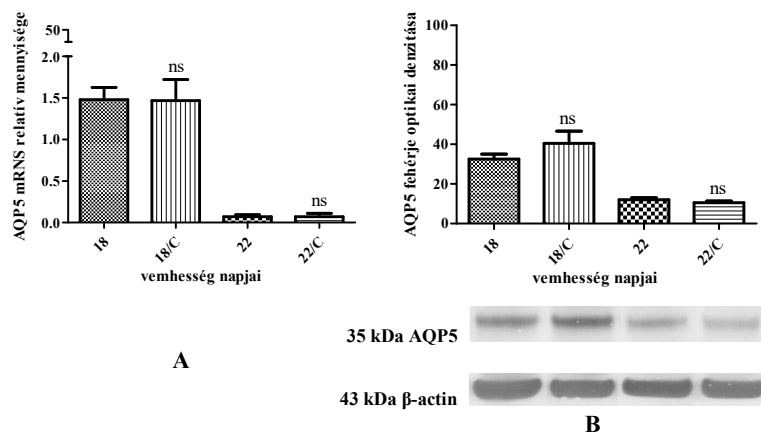
Sem az AQP5 mRNS (**3.A ábra**), sem a fehérje (**3.B ábra**) szintjét nem befolyásolta szignifikánsan a C kezelés a vizsgált napokon.



**1. ábra.** A RT-PCR és Western blot vizsgálatok eredményei E kezelés után. Az AQP5 mRNA és fehérje expressziójának változásai E előkezelés hatására 18 és 22 napos vemhes patkány uterusban. ns > 0,05; \*\*\*  $p < 0,001$ ; E: 17 $\beta$ -ösztadiol kezelt csoport



**2. ábra.** A RT-PCR és Western blot vizsgálatok eredményei T kezelés után. Az AQP5 mRNA és fehérje expressziójának változásai T előkezelés hatására 18 és 22 napos vemhes patkány uterusban. ns > 0,05; \* $p < 0,05$ ; T: tamoxifen kezelt csoport

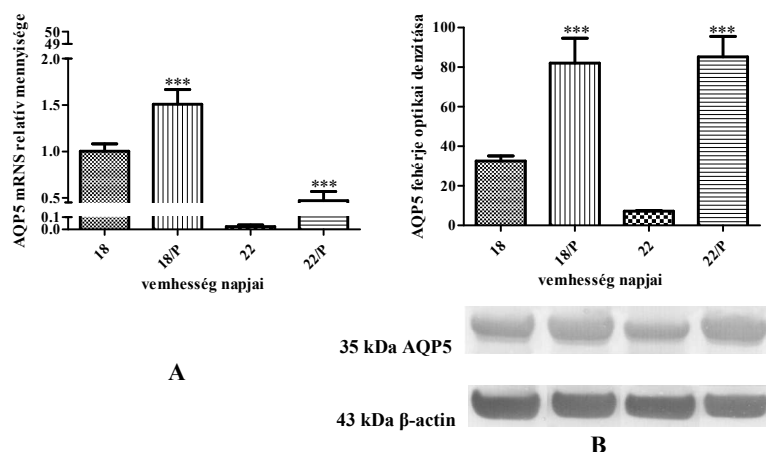




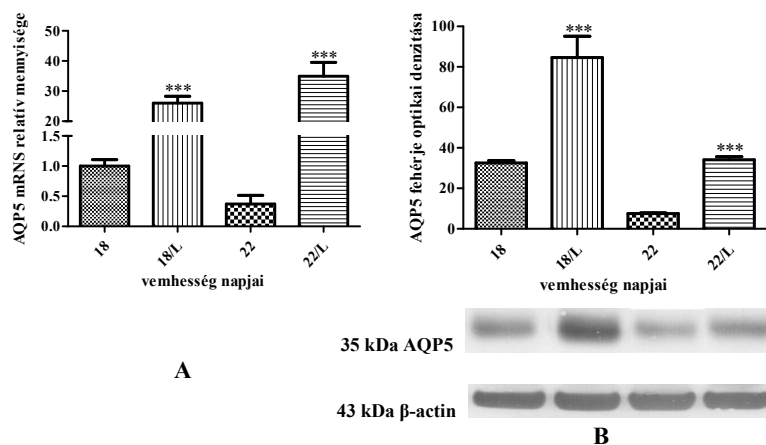
**3. ábra.** A RT-PCR és Western blot vizsgálatok eredményei C kezelés után. Az AQP5 mRNS és fehérje expressziójának változásai C előkezelés hatására 18 és 22 napos vemhes patkány uterusban. ns > 0,05; C: klomifen kezelt csoport

### Progeszteron-analóg hatóanyagok hatása az AQP5 expresszióra vemhes patkány uterusban

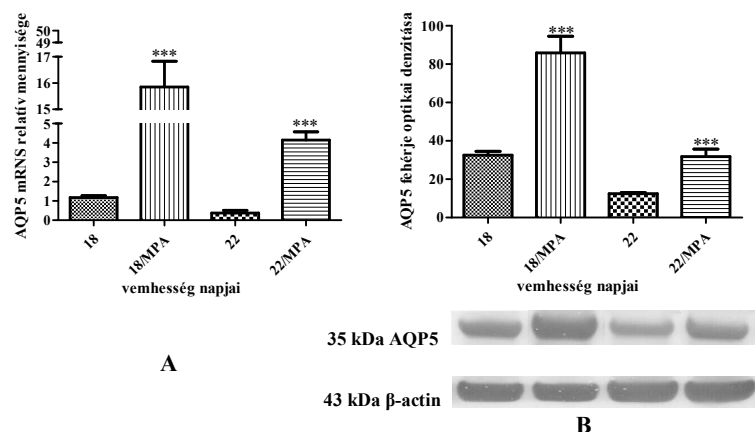
Mindegyik gesztagen hormon: P, L és MPA előkezelés szignifikánsan növelte mind az AQP5 mRNS, mind a fehérje mennyiségét a vemhesség 18. és 22. napján (**4-6. ábra**).



**4. ábra.** A RT-PCR és Western blot vizsgálatok eredményei P kezelés után. Az AQP5 mRNS és fehérje expressziójának változásai P előkezelés hatására 18 és 22 napos vemhes patkány uterusban. \*\*\*  $p < 0,001$ ; P: progeszteron kezelt csoport



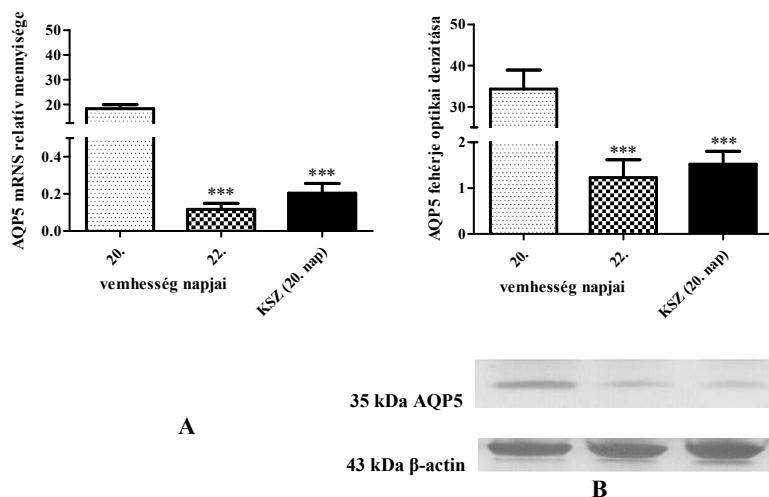
**5. ábra.** A RT-PCR és Western blot vizsgálatok eredményei L kezelés után. Az AQP5 mRNS és fehérje expressziójának változásai L előkezelés hatására 18 és 22 napos vemhes patkány uterusban. \*\*\*  $p < 0,001$ ; L: levonorgesztrel kezelt csoport



**6. ábra.** A RT-PCR és Western blot vizsgálatok eredményei MPA kezelés után. Az AQP5 mRNS és fehérje expressziójának változásai MPA előkezelés hatására 18 és 22 napos vemhes patkány uterusban. \*\*\*  $p < 0,001$ ; MPA: medroxiprogesteron-acetát kezelt csoport

### Hormonálisan indukált koraszülés hatása az AQP5 expresszióra vemhes patkány uterusban

Hormonálisan indukált KSZ szignifikánsan csökkentette az AQP5 mRNS és protein szintjét is a vemhesség 20. napján, a nem kezelt 20 napos vemhes patkány uterusához képest. Ez a csökkenés hasonló a fiziológias vemhesség utolsó napjához (7. ábra).



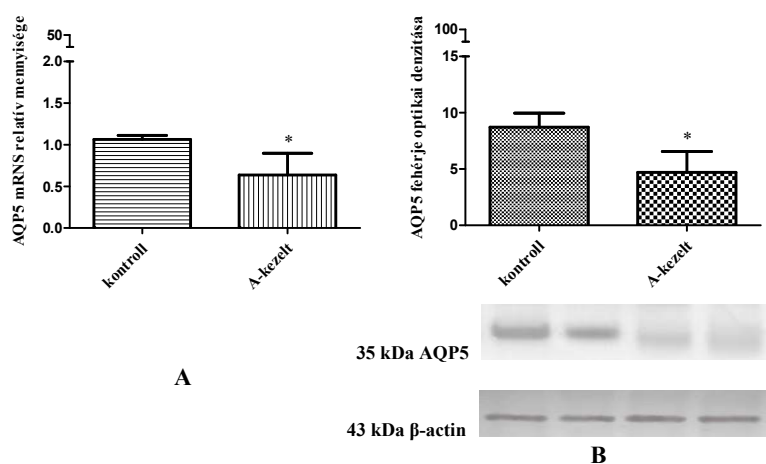
**7. ábra.** A RT-PCR és Western blot vizsgálatok eredményei hormonálisan indukált KSZ esetén. Az AQP5 mRNS és fehérje expressziójának változásai hormonálisan indukált KSZ hatására 20 napos vemhes patkány uterusban. \*\*\*  $p < 0,001$ ; KSZ: koraszüléses csoport

### Különböző antibiotikumok hatása az AQP5 expresszióra vemhes patkány uterusban

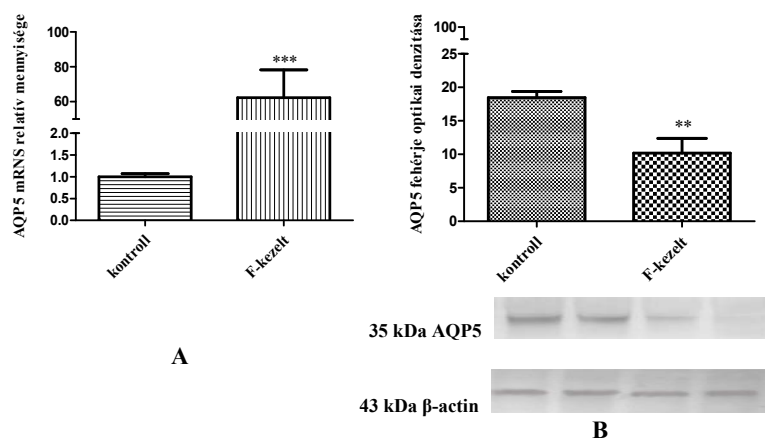
Az AQP5 mRNS (8.A ábra) és fehérje (8.B ábra) mennyiségét szignifikánsan csökkentette a 22. vemhességi napon a 7 napos A előkezelés, a nem kezelt utolsó napos vemhes patkány uterusához képest.

A F egy dózisa szignifikánsan emelte az AQP5 mRNS szintjét az utolsó vemhességi napon, a nem kezelt uterusához képest (9.A ábra). Az mRNS szinttel szemben, az AQP5 protein mennyiségét csökkentette a 22. vemhességi napon (9.B ábra).

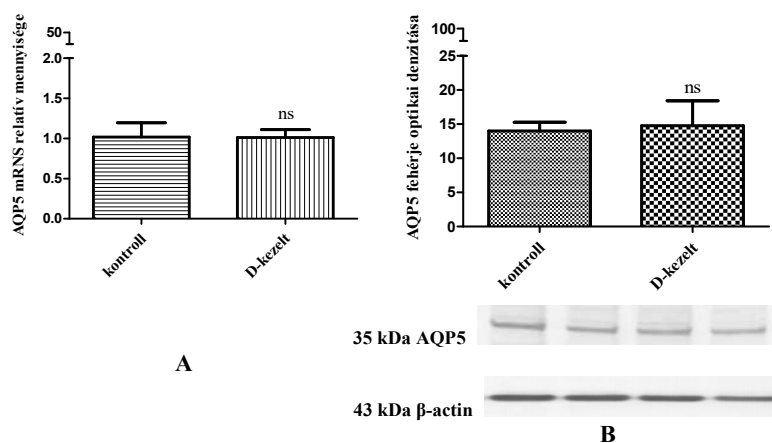
A 7 napos D előkezelés esetében nem találtunk változást sem az AQP5 mRNS, sem a fehérje mennyiségében az utolsó napon (10. ábra).



**8. ábra.** A RT-PCR és Western blot vizsgálatok eredményei A kezelés után. Az AQP5 mRNS és fehérje expressziójának változásai A előkezelés hatására 22 napos vemhes patkány uterusban. \*  $p < 0,05$ ; A: amoxicillin kezelt csoport



**9. ábra.** A RT-PCR és Western blot vizsgálatok eredményei F kezelés után. Az AQP5 mRNS és fehérje expressziójának változásai F előkezelés hatására 22 napos vemhes patkány uterusban. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; F: foszfomicin kezelt csoport

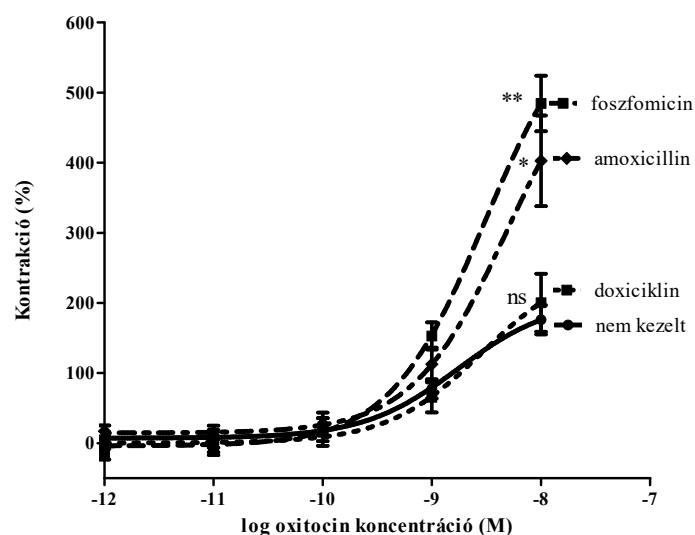


**10. ábra.** A RT-PCR és Western blot vizsgálatok eredményei D kezelés után. Az AQP5 mRNS és fehérje expressziójának változásai D előkezelés hatására 22 napos vemhes patkány uterusban. ns  $p > 0,05$ ; D: doxiciklin kezelt csoport

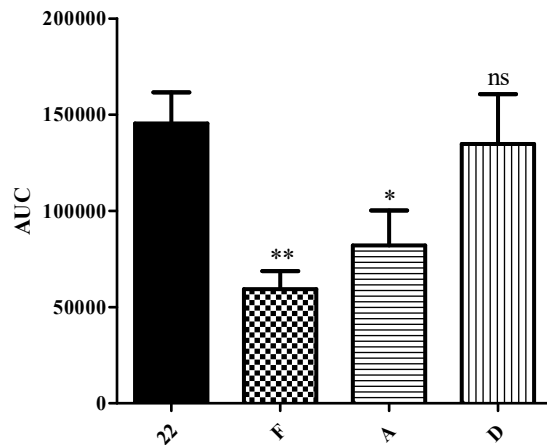
### Antibiotikum előkezelés hatása az oxitocin által kiváltott miometrium kontrakciókra *in vitro*

Ahogy a **11. ábrán** látható, az oxitocin ( $10^{-12}$ - $10^{-8}$  M) fokozta a miometrium kontrakcióját a 22. napos vemhes patkány uterusban. Az A és F előkezelések szignifikánsan emelték az oxitocin indukálta méhkontrakciókat. Ellentétben a D kezeléssel, ami nem befolyásolta az oxitocin által kiváltott uterus kontrakciókat (**11. ábra**).

A F és A kezelés csökkentette a spontán uterus kontrakciókat 22. vemhességi napon. Ezzel szemben, a D előkezelésnek nem volt hatása a spontán méhkontrakciókra (**12. ábra**)



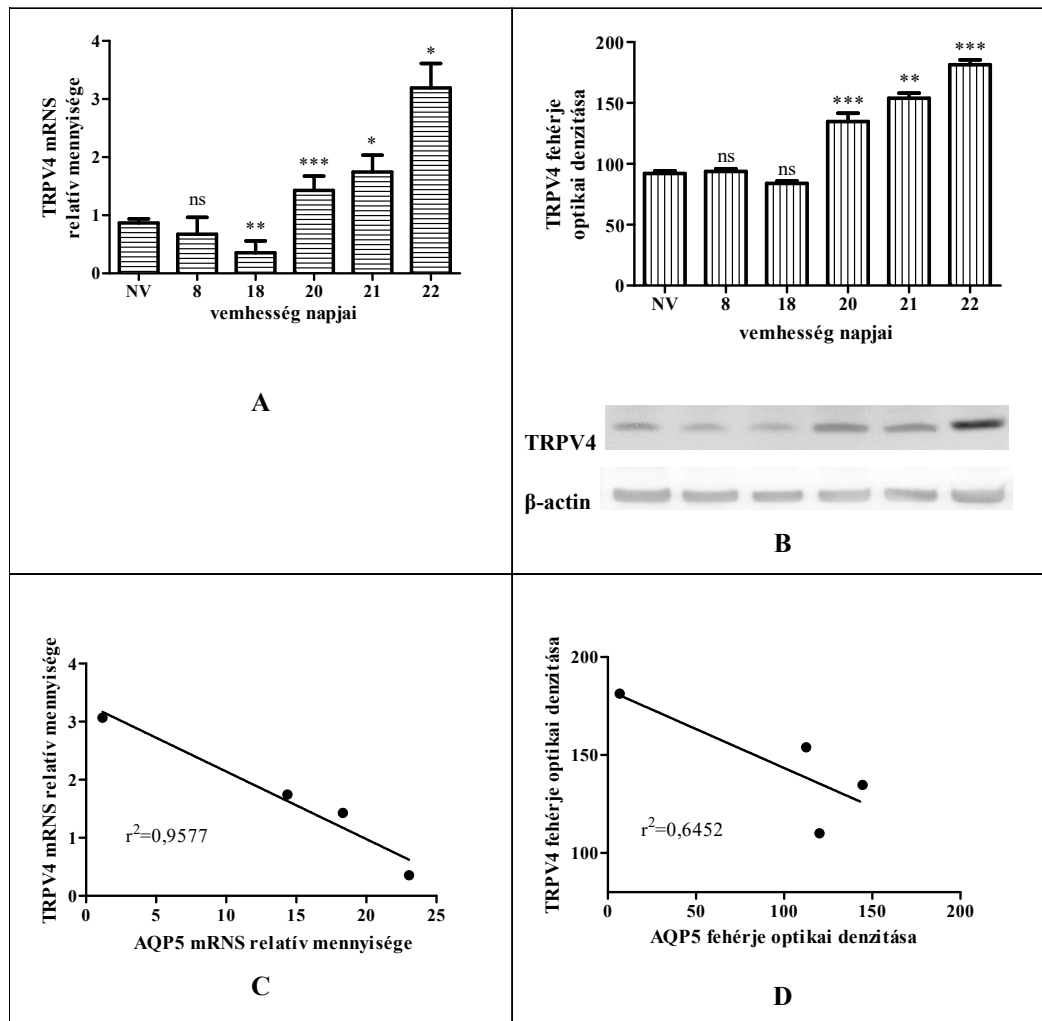
**11. ábra.** F, A és D előkezelés hatása 22 napos vemhes patkány uterus, oxitocin által kiváltott kontrakciójára. ns  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$



**12. ábra.** F, A és D előkezelés hatása spontán méhkontraktilitására 22 napos vemhes patkány uterusban. ns  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . 22: kontroll 22 napos vemhes uterus; F: foszfomicin; A: amoxicillin; D: doxiciklin kezelt 22 napos vemhes patkány uterus

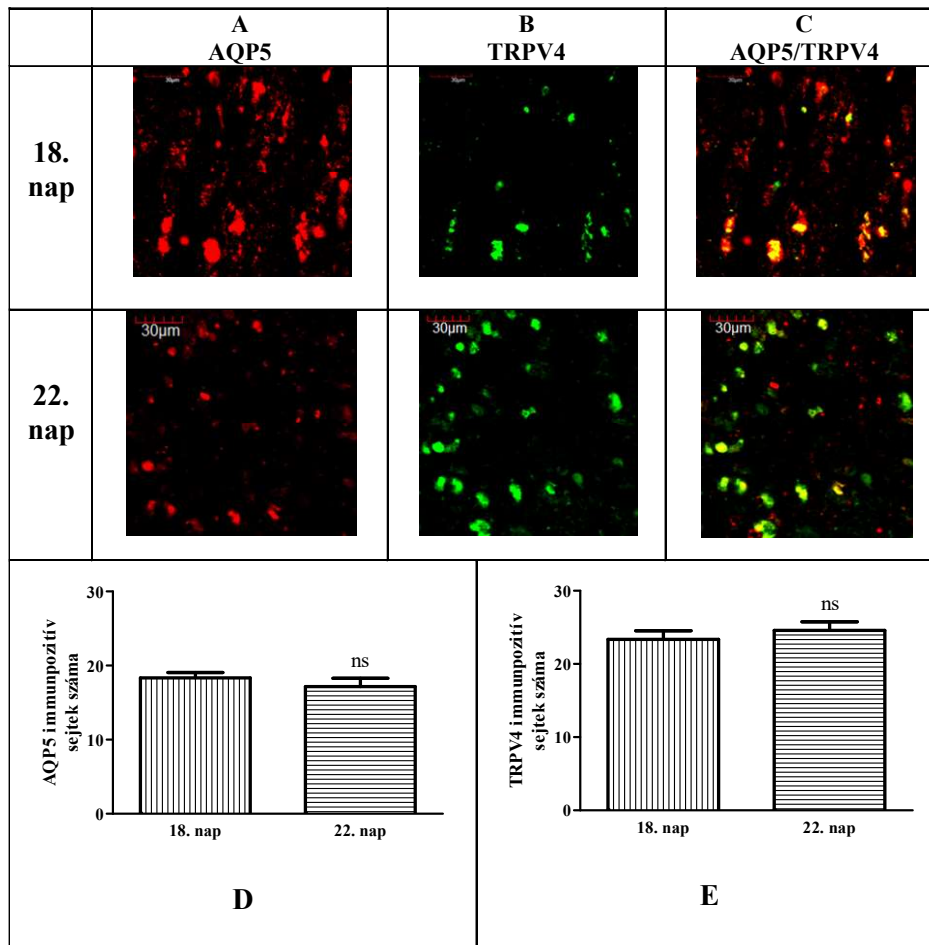
### A TRPV4 és AQP5 koexpressziója patkány uterusban

Meghatároztuk a TRPV4 mRNS és fehérje expresszióját nem vemhes és vemhes patkány uterusban (**13. ábra**). Összefüggést találtunk az mRNS és fehérje szintek között a vizsgált napokon. A vemhesség 18. napján volt a legalacsonyabb az mRNS és a protein szintje is, és fokozatosan emelkedett a szülés napjáig. A 18. vemhességi naptól a 22. napig az AQP5 és TRPV4 mRNS szintje erős korrelációt mutatott ( $r^2=0,9577$ ) (**13.C ábra**). Az AQP5 és TRPV4 fehérje expressziója között mérsékelt összefüggést találtunk ( $r^2=0,6452$ ) (**13.D ábra**).



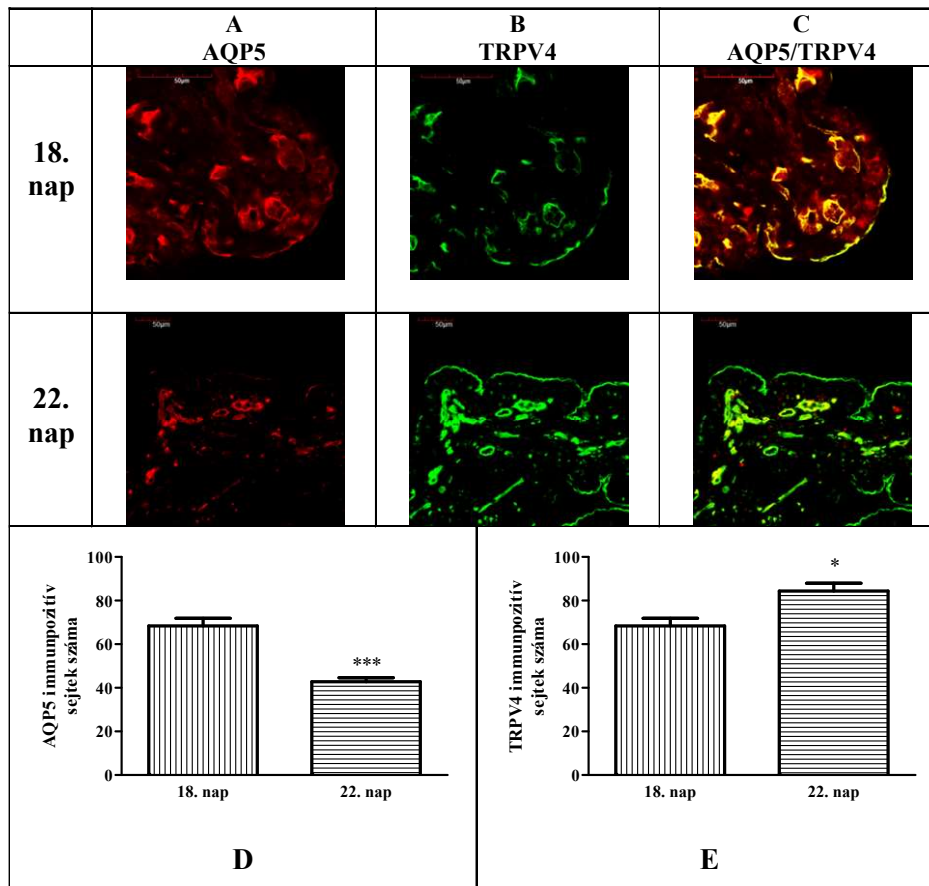
**13. ábra** Változások a TRPV4 csatorna mRNS (**A**) és fehérje expressziójában (**B**) nem vemhes (ösztarusos) és a vemhesség különböző napjain patkány uterusban. Összefüggés a TRPV4 és AQP5 mRNS (**C**) és fehérje (**D**) expressziójában a vemhesség 18. napjától a 22. napjáig, patkány uterusban. NV: nem vemhes, ns > 0,05; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; az előző naphoz viszonyítva

A 18. és 22. vemhességi napokon az AQP5 és TRPV4 csatornák száma nem mutatott szignifikáns változást a miometriumban (**14.D és E ábra.**).



**14. ábra.** Képek az AQP5 (A) és TRPV4 (B) expressziójáról és ezek koexpressziójáról (C), illetve ábrák az AQP5 (D) /TRPV4 (E) immunpozitív sejtek számáról, 18 és 22 napos vemhes patkány miometriumban. ns>0,05

A vemhesség utolsó napján az AQP5 immunpozitív sejtek száma szignifikánsan lecsökkent az endometriumban (**15.D ábra**). Másrésről az endometrium TRPV4 immunpozitív sejtjeinek száma szignifikánsan emelkedett a vemhesség 22. napján (**15.E ábra**). Igazoltuk, hogy az AQP5 és TRPV4 csatornák együtt expresszálódnak az endometriumban és a miometriumban a vemhesség mindkét vizsgált napján (**14.C, 15.C ábra**).

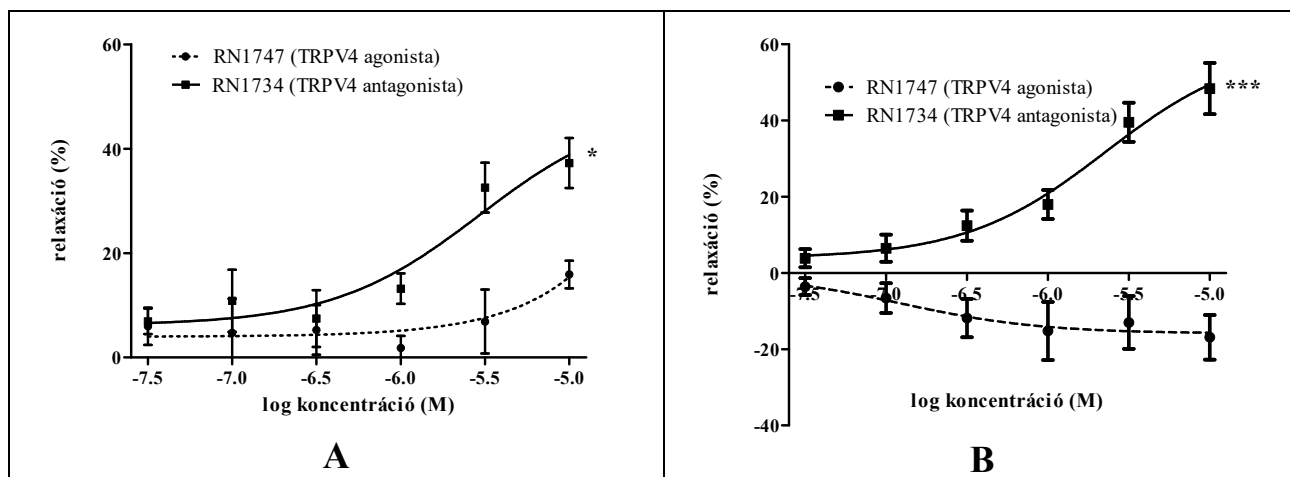


**15. ábra.** Képek az AQP5 (A) és TRPV4 (B) expressziójáról és ezek koexpressziójáról (C), illetve ábrák az AQP5 (D) /TRPV4 (E) immunpozitív sejtek számáról, 18 és 22 napos vemhes patkány endometriumban.  
 \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Megvizsgáltuk azt is, hogyan hatnak a TRPV4 agonista és antagonistá hatóanyagok az uterus kontrakcióra izolált szervfűrdőben (16. ábra). Az agonista (RN1747) enyhe relaxáló hatást mutatott a 18. vemhességi napon (9,93 %). Az antagonistá (RN1734) erősebb relaxáló hatást eredményezett (30,33 %) a 18. napon. (16.A ábra).

A vemhesség utolsó napján, az agonista nem okozott relaxáló hatást (-16,87 %), sőt a kontrakciót fokozta. Az antagonistának jelentős relaxáló hatása volt (44,52 %) a 22. napon (16.B ábra).





**16. ábra.** Szelektív TRPV4 agonista (RN1747) és antagonistá (RN1734) hatása KCl által kiváltott kontrakcióra 18 (A) és 22 (B) napos vemhes patkány uterusban. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$

## Diszkusszió

Korábbi vizsgálataink bizonyították, hogy az AQP5 vízcsatorna az egyik altípusa az AQP családnak, mely jelentős változásokon megy keresztül a vemhesség alatt patkány uterusban. Napjainkig több átfogó vizsgálat is tanulmányozta az AQP5 vízcsatornát különböző fajokban és szövetekben, de nem tudunk olyan vizsgálatokról, mely ezen csatorna expressziójára fókuszál vemhes patkány uterusban, női nemi hormon vagy antibiotikum kezelés után. Emellett nincs adat arról sem, hogyan befolyásolják az antibiotikumok a méh összehúzódásokat és az AQP5 és TRPV4 csatorna között milyen kapcsolat van vemhesség során patkány uterusban.

### AQP5 csatorna, női nemi hormonok és koraszülés

Bizonyítékok támasztják alá, hogy a nemi hormonok befolyásolják az AQP vízcsatornák expresszióját. Vizsgálataink szerint, a P, L és MPA kezelések szignifikánsan emelték az AQP5 kifejeződését. Eredményeinket megerősíti egy korábbi vizsgálat is, melyben fokozott AQP5 expressziót találtak magas P szint eredményeként kutyák méhében.

Vizsgálatainkban az E előkezelés csak az AQP5 fehérje mennyiségét növelte, a T és C kezelések nem változtatták az AQP5 expressziót. Feltételezzük, hogy a négy napos kezelés nem volt elég ahhoz, hogy befolyásolja a hipotalamusz-hipofízis rendszert.

Ahhoz, hogy tovább bizonyítsuk a P kiemelt szerepét az AQP5 expresszió módosításában, hormonálisan indukált koraszülés (KSZ) modellt használtunk. A folyamatot anti-gesztagén mifeprisztonnal és proszttaglandin E2-vel indítottuk be. Az AQP5 expresszió szignifikánsan lecsökkent a vemhesség 20. napján, amikor a KSZ beindult. Ez a változás az AQP5 expressziójában hasonló volt a vemhesség utolsó napján (22. napon) bekövetkező

csökkenéshez. Ez feltehetőleg azzal magyarázható, hogy a KSZ beindulásakor lecsökken a P szintje, ami AQP5 expresszió csökkenésével jár.

### **AQP5 csatorna és antibiotikum kezelés**

Az antibiotikum kezelés csökkentheti a koraszülés előfordulását, ami gyakran vezet hosszú távú neurológiai károsodáshoz, légzőszervi és akár gasztrointesztinális komplikációkhoz.

Amoxicillin előkezelés szignifikánsan csökkentette az AQP5 szintjét a vemhesség utolsó napján és a méhszövet fokozott kontraktilitást mutatott oxitocin hatására. Foszfomicin kezelés fokozta a miometrium érzékenységét oxitocin stimulációra. Eredményeink alapján megfontolandó a várandós nők kezelése A és F antibiotikumokkal, ezek uterus kontrakcióra gyakorolt szinergista hatása miatt.

### **Az AQP5 csatorna és TRPV4 receptor közötti kapcsolat**

Korábbi vizsgálataink alapján az AQP5 csatorna expressziója szelektíven csökken oxitocin hatására, mely felelős a méh kontrakciókért. Továbbá, a miometriumot relaxáló progesztogének emelik az AQP5 expresszióját. A fentiek alapján úgy gondoltuk, hogy fordított arányosság állhat fenn az AQP5 szint és a méhkontrakciók között. Azt feltételeztük, hogy az uterus simaizomsejtek szabályozása ozmotikus úton is végbe megy.

A TRPV4 receptor egy  $\text{Ca}^{2+}$  csatorna, mely ozmotikus hatásra aktiválódik és megtalálható a simaizom sejtekben, ahol, az AQP5 vízcsatornával kooperációban működik. A TRPV4 expressziója módosulhat hormonális változás hatására is patkány uterusban. A TRPV4 expressziót csökkentette a P humán trachea és emlőmirigy ductalis epithelium sejtvonalakon. Ez a vizsgálat alátámasztja eredményeinket, miszerint a csökkent P szint a vemhesség végén fokozza a TRPV4 expressziót az uterusban.

Vizsgálatainkban fordított arányosságot igazoltunk az AQP5 és TRPV4 expressziók között a késői vemhes uterusban. Immunhisztokémiai vizsgálattal koexpressziót bizonyítottuk az AQP5 és TRPV4 receptor között.

*In vitro* kísérleteinkben a TRPV4 antagonistá relaxáló hatást váltott ki vemhes patkány uterusban. Ezért a TRPV4 receptornak vélhetően szerepe lehet a kontraktilitás és a  $\text{Ca}^{2+}$  szignál szabályozásában.

Eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy a csökkent AQP5 expresszió ozmotikus stresszt idézett elő, ami aktiválta a TRPV4 receptorokat és fokozta az uterus kontrakcióit a szülés napján.

## Konklúzió

Eredményeink tükrében megállapíthatjuk, hogy (1) a P és P-analóg hormonok szignifikáns emelkedést okoztak az AQP5 mRNS és fehérje expressziójában. Feltételezzük, hogy egyenes arányosság van az AQP5 expressziója és a P szint között, és mindkettő esszenciális a terhesség fenntartásához. Bebizonyítottuk, hogy (2) a KSZ csökkenést okoz az AQP5 szintjében a vemhesség 20. napján. Véleményünk szerint ennek a P szint lecsökkenése lehet a magyarázata, hasonlóan az élettani szülés beindulásához. Az antibiotikum kezelés (3) az AQP5 expressziót módosította, ami fokozta az oxitocin által kiváltott méhkontrakciókat. Az A és F kezelés valószínűleg érzékenyítheti az uterust oxitocinra az AQP5 csökkent expresszióján keresztül, ami a vizsgált antibiotikumok új kontraindikációjára hívhatja fel a figyelmet. (4) Koexpressziót találtunk az AQP5 és TRPV4 csatorna között, továbbá (5) a TRPV4 antagonistá szignifikáns relaxáló hatást detektálva egy esetleges új terápiás targetet határoztunk meg a tokolízis kezelésére.

## Publikációs lista

### 1. Az értekezés alapját képező közlemények

**I. Csányi A, Bóta J, Falkay G, Gáspár R, Ducza E:** The effects of female sexual hormones on the expression of AQP 5 in the late-pregnant rat uterus.

*International Journal of Molecular Sciences* 17: (8) Paper: 1300, 13p. (2016) [IF: 3.226; Q1 in Medicine (miscellaneous) (2016)]

**II. Ducza E, Csányi A, Gáspár R:** AQPs during Pregnancy: Their Function and Significance.

*International Journal of Molecular Sciences* 18: (12) p.E2593 (2017) [IF: 3.687; Q1 in Medicine (miscellaneous) (2017)]

**III. Csányi A, Hajagos-Tóth J, Kothencz A, Gáspár R, Ducza E:** Effects of different antibiotics on the uterine contraction and the expression of AQP 5 in term pregnant rat.

*Reproductive Toxicology* 81 pp. 64-70., 7 p. (2018) [IF: 2.580; Q2 in Toxicology (2017)]

**IV. Közlésre benyújtva:** Ducza E, Csányi A, Szőke É, Pohóczky K, Hajagos-Tóth J, Kothencz A, Tiszai Z, Gáspár R: Significance of transient receptor potential vanilloid 4 and AQP 5 co-expression in the rat uterus at term.

*Heliyon* [IF:- ; Q1 in Multidisciplinary]

## **2. Előadások az értekezés témájában**

**I. Ducza E, Csányi A, Gáspár R.**

Pharmacological influence of myometrial AQP 5 expression in pregnant rat

Acta Physiologica (2015) (Poszter)

**II. Ducza E, Csányi A, Gáspár R.**

Az AQP 5 expressziójának változása hormonális hatásokra vemhes patkány uterusban

FAMÉ, Magyar farmakológiai, anatómus, mikrocirkulációs és élettani társaságok közös tudományos konferenciája, Pécs, Magyarország, (2016) (Poszter)

**III. Csányi A, Hajagos-Tóth J, Gáspár R, Ducza E.**

Antibiotikumok hatása az AQP 5 expressziójára vemhes patkány uterusban

Tavaszi Szél Konferencia 2017: Nemzetközi Multidiszciplináris Konferencia: Miskolc, Magyarország: Doktoranduszok Országos Szövetsége, (2017) (Előadás)

**IV. Csányi A, Hajagos-Tóth J, Gáspár R, Ducza E.**

The effects of the antibiotics on the expression of AQP 5 in the pregnant rat uterus

RECOOP, Budapest, Hungary, 2017 (Előadás)

**V. Ducza E, Csányi A, Szőke É, Tiszai Z, Gáspár R.**

Significance of co-expression of transient receptor potential vanilloid 4 and AQP 5 in pregnant uterine contractility in rats

FEPS, Vienna, Austria, 2017 (Poszter)

**VI. Csányi A, Ducza E, Hajagos-Tóth J, Gáspár R.**

The effects of the amoxicillin, fosfomycin and doxycycline on the AQP 5 expression in rat uterus before delivery

FEPS, Vienna, Austria, 2017 (Poszter)

## **3. Egyéb közlemények:**

**I. Hajagos-Tóth J, Bóta J, Ducza E, Csányi A, Tiszai Z, Borsodi A, Samavati R, Benyhe S,**

**Gáspár R:** The effects of estrogen on the  $\alpha 2$ -adrenergic receptor subtypes in rat uterine function in late pregnancy in vitro.

*Croatian Medical Journal* 57 : 2 pp. 100-109. , 10 p. (2016) [IF: 1.619; Q2 in Medicine (miscellaneous) (2016)]

II. Kothencz A, Hajagos-Tóth J, **Csányi A**, Gáspár R: Alpha-tocopherol succinate increases cyclooxygenase-2 activity: Tissue-specific action in pregnant rat uterus in vitro.  
*Life Sciences* 192 pp. 199-204. , 6 p. (2018) [IF: 3.234; Q1 in Medicine (miscellaneous) (2017)]